DOWNSTREAM No.26
……日本語版・要約編……

p. 3-5
Large-scale purification of oligo's on SOURC

SOURCE担体による合成オリゴヌクレオチドの大量精製

オリゴヌクレオチドによる治療の発展が注目を浴びつつあります。市販製品としてのDNA治療薬が直面している問題は、費用に対するもっとも効率の良い製造方法の確立です。必要とされる純度と生産性を達成するためには、生産スケールにおける効率の良い化学合成が適切な精製方法と結びつかなければなりません。弊社では、Zeneca LifeScience Molecules社との協力のもと、治療用DNAとしてのオリゴヌクレオチドの生産スケールでの精製の採算性の検討を行ました。

リコンビナントDNA技術は、製薬産業に大きなインパクトを与えました。この結果、新しい治療薬、予防薬は細菌、酵母、細胞培養由来の物に変わり、多くの診断薬やいくつかのin vivoでのモノクローナル抗体の応用例がでています。まだ驚くことに、DNA/RNA治療薬は市販されていません。しかし、オリゴヌクレオチドはフェーズ「 やフェーズ」トライアルで良好な結果を得ていますので、市販されるのは時間の問題です。

Real-life application

複雑な分子の大量スケールでの製造は、費用に対しもっとも効率の良い化学合成や精製方法が必要になります。弊社とZeneca LifeScience Molecules社は、共同で採算性の検討を行いました。Zeneca社は、液相化学に基づく化学合成のパイオニアです。独自にSOUCE 15Qがラボスケールでのオリゴヌクレオチドの分離に適した担体であることを見出しており、大量スケールでの精製を行う研究のパートナーを捜していました。そして、我々はSOURCE担体とFineLINEカラムによるスケールアップのreal-lifeテストに関心を持っていました。

Purification challenge

研究で使用されている目的の化合物、相対的に短いにもかかわらず分子内外での水素結合を形成する性質が、合成が途中で止まったものからの分離を潜在的に難しくしているため、精製の試行錯誤が必要になりました。精製前に、リン酸と塩基についている全ての保護基を化学的にはずし、合成物は有機溶媒での洗浄後水に置換します。DMTrグループをはずし取り除いたあと、低分子の不純物は、ゲルろ過担体Sephadex G-25で分離することができます。同時に、合成物はこの後の工程に適した溶液に置換されます。このステージでの純度は、約39%でした。

From AKTAexplorer to customized FineLINE

多くのパイロットスケールの精製は、SOURCE 15QをつめたFineLINE Pilot 35カラム（内径35mm、ベッド高140mm、ゲル量135ml）とÄKTA*explorer* を用いて行われました。条件が至適化された後、カスタムデザインのFineLINE（内径800mm、ベッド高140mm、70Lゲル容量）まで、スケールアップを行いました。この方法では、再生も含めたサイクルタイムは、約2.5時間でした。

Encouraging results

パイロットスケールと大量スケールの結果は、ほとんど同じパターンであり、スケールアップによる分離能とプロダクトの回収率の低下も特に問題がありませんでした。回収された画分の最終純度は、約97.8%で回収率は65%を越えました。

A feasible route

合成手法に限らず医薬品として使用する前には、オリゴヌクレオチドを精製するために実現可能なルートが必要です。Zeneca社との協力は、オリゴヌクレオチドの精製にSOURCE 15Qのアプリケーションが現実的であることをここで述べています。ラボスケールでの成功は大量スケールでの生産を可能にさせました。Zeneca社のJohn Parker氏は「このプロジェクトが、スケールアップ可能な方法によるオリゴヌクレオチドの合成と、次の大量スケールでの精製の両方の実現可能性を証明することで、お互いの協力は成功に終わった。」と結論しています。


GE imagination at work

p.6-7
Validation Issues for antisense drugs

アンチセンス医薬品のバリデーション

最近のChemical and Engineering Newsでアンチセンスについての至適化が記事になりました。Crohn s病、RSV、HIVの臨床試験は良好な結果で、合成コストや医薬品としての質も安定しているようであると報告されています。今は、もう製造設備としてのバリデーションに取り組みはじめています。

現在、アンチセンス医薬品の分野にはごく限られた規制やガイドラインなどしかありません。しかし、他のペプチドなどの合成医薬品とほぼ同様に製造する立場にとって必要な情報は十分にあると思われます。
規制当局側もオリゴヌクレオチドの合成や精製を着手している製造施設に関して様々な検討を開始しています。

現在の取り組み

FADの " Guideline for Industry for the Submission of Chemistry,Manufacture and Control Information for Synthetic Peptide Substance " では、目的物質の詳細な説明と性質分析を要求しています。一方ホスホロチオネート化されたオリゴヌクレオチドについてS.T. Crooke氏は、構造、組成分析、基本配列、リンクされたホスホロチオネートの比率、分子量、含有金属イオン量を含めて性質分析が必要であるとしています。

ペプチドの合成に関していえば、出発原料、合成フロー、合成の詳細、精製の方法などの点をバリデートする必要がありますが、オリゴヌクレオチドの場合にはアミダイドとプライマーサポートに関してもバリデートする必要があります。
出発原料の分析が当然必要になるため、ベンダーに関してバリーデートする必要性があります。

合成、精製ともに実験結果を記載したラボノートに基づき開発過程を明確にすることが重要であるばかりでなく、許容範囲に適合する出発原料を使用することも重要です。合成ヌクレオチドの精製には、溶媒やバッファーやクロマトメディアについても検証する必要性があります。

装置の検証

装置に関する検証としては、合成と精製の両方の装置についても検証する必要があります。当社では、IQ／OQのパッケージとFast Trak サービスの供給と医薬品を合成、精製するバイオプロセスシステムとオリゴプロセスシステムが皆様のお役に立てることをお約束します。

遅れをさけるために

いち早く商品を市場に出すという命題とバリデーションは、別々に大きなプレッシャーを与えるようなことがありますが、アンチセンス医薬品の製造に関しては、これまでの合成医薬とほぼ同様となるためさほど難しいものではありません。常識的で科学的な考え方が大切なことです。

p. 8-10
Column packing studies

カラム充填に関する十分な知識

素早く確かなパッキング方法、工程を至適化するための迅速な方法、操作のパフォーマンスを最大にする方法、これらはカラムのパッキング技術において専門家である我々から作業者である皆様に提供できる利点です。弊社では長年にわたってゲル担体やカラムやハードウェアの研究を重ねてきました。こうして培われた経験と専門的な知識によってパッキング技術やカラムの性能の標準的な評価方法を築き上げることができたのです。

Packing-a testing time

カラムのパッキング方法はゲル担体やカラムとの組み合わせによって異なります。注意すべき点は、すべてのゲル担体がすべてのカラムに至適化された方法でパッキングできるわけではなく、それぞれに適した条件の範囲があります。パッキング方法の検討により、実際の工程がスムーズに進み、無駄な時間を省くことができます。

Basic parameters

我々は新しい製品を販売する前に一連の試験を行ないます。お客様がカラム性能を測定するために再び試験ができるように、これらの試験やその結果はカラムの取扱説明書に記録されます。

圧力流速曲線

ゲル担体に関する情報が何もない場合は、パッキング時の流速と通常操作時の流速を決定するために圧力流速曲線を作成します。まず、適量のゲルをカラムに入れ、低い流速でカラムにバッファーを送液します。それ以上圧力が上がらない時点か、カラムの最大操作圧に達するまで流速を徐々に増加させ、記録した圧力と流速からグラフを作成します。最適パッキング流速は最大流速の70～100%です。パッキング時の流速が高すぎても低すぎてもカラムの性能に悪影響が出ます。最適な通常操作時の流速は、パッキング時の流速の約70%です。

HETPとAsの測定

カラムの効率はいかにうまくパッキングされたかで決まります。ゆるく充填されたカラムでは流れにムラができ、分離能が悪くなります。ですから充填されたカラムを実際に使用する前にカラムのテストをすることが大切です。我々が皆様にお勧めしているのはHETP（理論段相当高さ）とAs（アシンメトリーファクター）の測定です。これらは充填されたカラムの状態を知る簡単な方法ですので、カラムをパッキングした後や保存後、操作と操作の間に是非行なって下さい。

HETP

測定のサンプルには1% アセトン溶液や塩化ナトリウム溶液などを用います。サンプルはゲル担体やカラムに対して反応性を持たない物でなければなりません。各ゲル担体のHETP測定条件はインストラクションに記載されています。その結果からHETPとAsを計算します。計算結果は測定条件によって異なりますので、あくまでも参考値として下さい。結果を比較したい場合は、測定機器や条件を同じにしなければなりません。デッド体積、溶液、サンプル体積、流速、温度などすべてが結果に影響します。
HETPは使用する際の許容基準となりえます。異なるカラムでの性能を比較するために「還元理論段」の概念が用いられます。

還元理論段＝HETP / dp　dp : ゲルの粒子径
一般的にこの値が3以下であれば良いとされますが、大量スケールのクロマトグラフィーの場合は3～5の範囲と言われています。

As

理想的にはピークは左右対称でなければなりません。非対称の原因は主にゲル担体とサンプルの相互作用およびパッキングが不十分であることに起因します。パッキング状態の悪化はピークの対称性の変化として現れます。

参考値：
　ベッド高30cm以下の場合；As=0.8～1.8
　ベッド高30cm以上の場合；As=0.8～1.5
　ゲルろ過クロマトグラフィーの場合；As=0.8～1.2

Extensive studies

さらに我々が行っている試験には以下のものがあります。
・至適パッキング圧の決定
・至適パッキング流速の決定
・一定流速でパッキングを行う際の一定圧力の比較
・繰り返しパッキングデータ（HETP & As）
・繰り返し安定性試験（一定時間、圧力をかけた後にHETPとAsを測定）
・ゲル担体の適切なスラリー濃度
・パッキングに適した溶液（例：水、エタノール）
・パッキング時間とカラム操作の簡便化
上記の試験項目は新しいカラムやアレンジされたカラムなどについてルーチンに行われるべきです、また、ゲルの発展には必要不可欠なものです。

Behind the column

全てのカラムには、推奨されるゲル担体のリストや推奨されるパッキング方法が記載されたインストラクションが付いています。その他、カラムの仕様や材質、化学的融和性、

構造図、メンテナンスやスペアパーツリスト、アクセサリーリストなど、お客様がカラムを使用されるにあたって必要な情報が盛り込まれています。我々が開催するFast Trakサービスのトレーニングコースにおいて、更に詳しい情報をご提供しております。

Complete solution

カラムとゲル担体さらにパッキング技術を「トータル・ソリューション」として提供し、お客様の実験に対して高レベルのサポートを行います。実験室スケールから生産スケールまで、ゲル担体とカラムとシステムをクロマトグラフィーのユニットオペレーションとして提供することが我々のねらいです。

バイオプロセス部では『アマシャム ファルマシア バイオテク サイエンスプログラム』の一環としてFast Trak プロセスカラムパッキングトレーニングコースを日本国内で開催しております。詳細についてはお問い合わせください。

p.11
Effective Virus Removal and Inactivation With STREAMLINE

STREAMLINEによる効果的なウイルスの除去と不活性化

STREAMLINE rProtein A 担体を用いた抗HIV－1モノクローナル抗体の精製工程において、ウイルスの除去と不活性化の効率が二つの方法について調べられました。ウイルスはインフルエンザウイルス25A-1とポリオウイルス1型が検討されました。バッファー中に界面活性剤を添加することにより、効果的なウイルスの減少が示されました。

抗HIV－1モノクローナル抗体の精製工程において、まず、ウイルスの除去と不活性化の効率が検討されました。最初に、STREAMLINE rProtein A 担体の洗浄、溶出バッファーによる効果と、次に酸性溶出バッファーによるインキュベーション効果の2つの方法について検討されました。

工程と試験方法
その1

抗体の回収、精製は図１に示されるシステムを用いて行われました。STREAMLINE rProtein A 担体は表1にあるバッファー1で上昇流による流動床の形成と平衡化が行われました。サンプルの培養上清には評価のためにインフルエンザウイルス25A-1とポリオウイルス1型が添加されました。サンプル添加後、Benzonase（エンドヌクレアーゼ）と界面活性剤を含んだバッファー2に切り替え、約8時間ほどリサイクルさせてDNA/RNAの分解とウイルスの不活性化を行ないました。このあと再びバッファー1で再平衡化を行い、UV吸収がベースラインまで戻ったところでSTREAMLINE吸着体を沈降させ、バッファー3で抗体画分の溶出を行いました。システムはさらにバッファー4、および5によって吸着体の再生、洗浄、滅菌が行われました。

サンプリングと試験

培養上清とカラムからのいくつかの段階の溶出画分はウイルス活性の試験に使用するサンプルとしてウイルス不活性化の効率が調べられました。ウイルスの粒子数はTCID50法で計測されました。表2にその結果が示されています。溶出画分のモノクローナル抗体の含有量と純度はELISA法とゲルろ過法によって調べられました。

その2

ウイルスの不活性化についてもうひとつ溶出バッファーとして用いられるpH 3の酸性バッファーによる効果が調べられました。ウイルス粒子数はそれぞれ5分から120分の処理の後TCID50法により計測されました。

ウイルスの減少効果

これらの実験の結果、2種類のウイルスのいずれもがSTREAMLINEカラムによる工程で効果的に除去されていました。表2に示されるように工程の前に比べて、インフルエンザウイルスの数は約1億分の1に、またポリオウイルスの数は約400万分の1にまで減少されされました。また溶出画分のpH3条件での処理は表3に示されるように、インフルエンザウイルスでは63万分の1まで減少しましたが、しかしポリオウイルスにはあまり効果がありませんでした。

相乗的な効果

今回のSTREAMLINE rProtein A担体を用いた吸着流動床によるモノクローナル抗体の精製では最終的な抗体の純度は97%以上、回収率は95%以上を達成し、同時に効果的に混入したウイルス数を減少できることが示されました。

今回のSTREAMLINEを用いたアプリケーションについては、アプリケーションノート“ Evaluating virus removal / inactivation in a process to purify anti HIV-1 human monoclonal antibody by expanded bed adsorption ” により詳しい記載がございます。ご興味のある方は添付させていただいた資料請求用紙にてご請求ください。

Meeting Report
p.13
6th Annual Meeting on Bioseparation and Bioprocessing of Biological Molecules, Queens College , Cambridge , UK, 10-12 September , 1997

バイオ医薬品の製造業界の最新のトレンドを知ることのできる会合が昨年イギリスのケンブリッジで開かれ、Affinity Chromatography、Transgenic Production、Time to Market、Outsourcing、Regulatory issues、Process control 、Animal sources等の様々なテーマにおいて活発な意見の交換が行なわれました。今回の会合は約70名と小さな集まりでしたが、多くの有益な討論がもたれました。同じような会合は次回1998年4月にイギリスのケンブリッジで予定されています。

p.14
8th European Congress on Biotechnology, ECB 8, 70th Event of the European Federation of Biotechnology , Budapest , Hungary , 17-21 August

High throughput screening技術がこの会議では全員参加の講義におけるトピックでした。Gene Logic Inc.社のErik M. Eastman氏は、このテクニックが少なくとも 新しい薬の発見段階の労力の50% を減少させることができると強調しました。

環境の問題
バイオテクノロジーの環境の面に関係したたくさんの講義が行われました。今後は我々が新しい供給原料の製造とエネルギー製造を統合することを考えなければならないことをTU Delft社の van Loosdrecht氏は提案しました。

食品産業
Finnfeeds International Ltd社のA. Morgan氏は、食品産業におけるバイオテクノロジーの増大する重要性について話しました。氏は食品産業がバイオテクノロジー産業の最も大きい市場の１つであると主張しました。

リカバリープロセス
Novo-Nordisk社のHenrik Valore氏は、インシュリンの回収のために 目的別に設計されたアフィニティーリガンドを使う彼らのプロセスから得られたデータを示しました。Amersham Pharmacia Biotech社のRolf Hjorthは10000 L を越える産業スケールにスケールアップを行なった吸着流動床技術の使用について述べました。

クロマトグラフィー
活発な討論が、Chromatography Task Forceにおいて「Continuous Chromatography」について持たれました。Amersham Pharmacia Biotech社のLars Hagelが、従来の精製工程における各々のクロマトグラフィーによるステップがそれぞれ最適化される必要があると指摘し、Continuous chromatography の必要性に関して討論を始めました。今回の討論で出された結論は、Continuous chromatography の市場必要性がまだ疑わしいということでした。

幅広いトピック
少なくとも1500名の科学者が、様々なトピックを網羅したこの会議に出席しました。次回のECB 9は、1999年7月にベルギーのBruxellesでの開催が予定されています。

p.15
Second International Conference on Expanded Bed Adsorption(EBA) Napa Valley, Carifornia, USA 21-23 June 1998

第2回 吸着流動床 国際会議 開催のお知らせ

最初のEBA国際会議は1996年12月に英国ケンブリッジで盛会に開催され、この新しく開発された技術に関して多くの有意義な議論がなされましたことは先のdownstream No.24にてご紹介致しました。このEBAの技術は既にダウンストリームの非常に有効なキャプチャリング技術として認められてきており、今回の第２回めの会議では参加者は更なる技術的開発の紹介やバイオテクノロジー応用医薬品製造への利用における様々な指針が示されるものと思われます。
内容の詳細に付きましてはアマシャム ファルマシア バイオテクまでお問い合わせ下さい。また、この会議につきましてはインターネットホームページ（http://www.bo-conf.com/eba98）にも詳細が公開されておりますのでご利用ください。

p.15
新会社設立のお知らせ

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH

アマシャム ライフサイエンスとファルマシア バイオテクの統合は1997年8月6日に完了しました。今回の統合は2社の互いに得意な分野を更に補う合うような形で完遂することが出来、『ライフサイエンス、バイオテクノロジーおよび医薬品会社における医薬品の探索、開発および製造においてそのスピードと簡便性と安全性において卓越した支援ができる世界的に市場をリードする会社となる』ことができるものと確信しています。
アマシャム ライフサイエンスは医薬品の探索、ジェノミクスおよび細胞生化学の研究において世界的をリードする会社としてエンジニアリングやソフトウェアおよびシステムなど総合的に供給できるパートナーを探していました。一方、ファルマシア バイオテクは化学品からソフトウェアおよび装置をバイオテクノロジー企業に提供する世界的をリードする企業として新しい経験を持ち、より広く世界的に研究段階から医薬品の製造までバイオテクノロジー全般において問題解決を図り、皆様方の支援のできる会社となることのできる相手を探していました。
両者の統合により皆様方には以下のような利点を見い出して頂けることと思います。
- ●新しい技術を皆様に利用して頂けるようになるまでの時間を短縮する事が出来る。
- ●R&Dに対する投資を増加する事が出来る。
- ●両者の製品の補完により一社によりほぼ全ての技術をサポートする事が出来る。
- ●全体的にお客様へのサービスレベルを上げる事が出来る。

新会社は以下の新しいロゴをもって皆様にご奉仕致します。

内容に関するお問い合わせは、
アマシャム ファルマシア バイオテク（株）
インダストリー事業部　TEL:03-5992-3426 までお願いいたします。


GE imagination at work

発行者：アマシャム ファルマシア バイオテク
（株）インダストリー事業部　バイオプロセスグループ